

7. Radi R. et al. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls // J/Biol Chem.-1991.-266.-P. 4244-4250.
8. Tanphaichitr, V. in Handbook of vitamins (Rucker, R., Suttie, J. ed.), Marcell Dekker, N.Y. -2001.-P. 275-316.
9. Calingasan, N.Y., Chun, W.J., Park, L.C., Uchida, K., Gibson, G.E. Oxidative stress is associated with region-specific neuronal death during thiamine deficiency // J. Neuropathol. Exp. Neurol.-1999.-58. -P. 946-958.
- 10.A. Henglein, C. Kormann. Scavenging of OH radicals produced in the sonolysis of water // Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem.-1985.-Med. 48 (2).-P. 251-258.
- 11.Uppu R.M., Pryor W.A. Biphasic synthesis of high concentrations of peroxynitrite using water-insoluble alkyl nitrite and hydrogen peroxide // Methods Enzymol.-1996.-Vol. 269.-P. 322-329.
- 12.J.S. Beckman, J. Chen, H. Ischiropoulos, J.P. Crow. Oxidative chemistry of peroxynitrite // Methods Enzymol. -1994.-Vol. 233.-P. 229-240.

## **ВЛИЯНИЕ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА НА СРОДСТВО ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ IN VITRO В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОЙ ОКСИГЕНИРОВАННОСТИ КРОВИ**

**Степура Т.Л., Зинчук В.В.**

*УО «Гродненский государственный медицинский университет»,  
Беларусь*

Оксид азота (NO) наиболее известен как фактор регуляции тонуса сосудов, нейротрансмиттер, агент, образующийся в макрофагах для обеспечения защитных функций организма. Гемоглобин (Hb) в отношении NO рассматривают в качестве инактиватора или транспортной формы последнего [Sonveaux P. et al., 2007]. Предполагается также, что NO может выполнять функцию аллостерического регулятора кислородсвязывающих свойств гемоглобина [Stepuro T.L., Zinchuk V.V., 2006]. Исходя из выше изложенного, была поставлена цель оценить влияние доноров оксида азота на сродство гемоглобина к кислороду (СГК) in vitro в условиях различного насыщения крови кислородом.

**Материалы и методы.** Во всех экспериментах использовалась смешанная венозная кроличья кровь ( $n=9$ ). В первой серии опытов кровь инкубировали 30 минут при 37 °С в анаэробных условиях с нитрозоцистеином (Cys-SNO) и S-нитрозо-N-ацетилпенициламином (SNAP) в концентрационном соотношении гемоглобина (тетрамера) и образующегося из донора NO 1:1. Во второй серии опытов образцы крови инкубировали с Cys-SNO, SNAP и диэтиламин-NO (DEANO) при соотношении NO и гемоглобина (тетрамера) равном 1:2. Изначально донор добавляли в сатуратор, где происходило насыщение крови

оксигенирующей смесью (94,5%  $O_2$  и 5,5%  $CO_2$ ), а во втором опыте дезоксигенирующей смесью (94,5%  $N_2$  и 5,5%  $CO_2$ ). Время инкубирования крови с донорами во второй серии составляло 30 минут. В контрольных образцах кровь смешивали с изотоническим 0,9% раствором хлорида натрия. Показатель сродства –  $p50$  определяли методом смешивания с помощью микрогазоанализатора Synthesis-15 (Instrumentation Laboratory). Напряжение углекислого газа ( $pCO_2$ ), кислорода ( $pO_2$ ), pH крови и количество метгемоглобина измеряли с помощью Synthesis-15 (Instrumentation Laboratory). Спектр нитрозилгемоглобина ( $HbFe^{2+}NO$ ) регистрировали на ЭПР-спектрометре Varian E-3 при температуре 77K. Интенсивность сигнала  $HbFe^{2+}NO$  измеряли двойным интегрированием полученного спектра с помощью компьютерной программы. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью компьютерной программы "Statistica".

**Результаты и их обсуждение.** В первой серии опытов при инкубировании крови с Cys-SNO или SNAP реальные показатели СГК не изменялся. Однако, приведение  $p50$  к стандартным условиям pH,  $pCO_2$  и температуры обнаруживало увеличение сродства крови к кислороду на 2,85 мм рт. ст. ( $p<0,05$ ) в случае с Cys-SNO и на 3,34 мм рт. ст. ( $p<0,05$ ) со SNAP. В пробе с Cys-SNO наблюдался достоверный прирост  $pCO_2$  на 15,48% ( $p<0,05$ ) и снижение на 34,04%  $pO_2$  ( $p<0,05$ ). Смешивание крови как с Cys-SNO, так и со SNAP привело к снижению pH на  $0,1\pm0,02$  ( $p<0,05$ ) единиц в первом случае и на  $0,06\pm0,01$  ( $p<0,05$ ) во втором. Добавление к крови доноров оксида азота вызывало окисление гемоглобина в метформу, количество которой достоверно возросло в 10,04 раза в опыте с Cys-SNO и в 3,31 раз в опыте со SNAP. Расчет интенсивности сигнала нитрозилгемоглобина в присутствии доноров NO показал прирост данного показателя относительно контроля в обоих случаях. Инкубирование крови с Cys-SNO, SNAP или DEANO в условиях дезоксигенации не привело к изменению положения кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) в образцах. Достоверный прирост количества метгемоглобина на 191,46% ( $p<0,05$ ) наблюдался только в опыте с Cys-SNO. Интенсивность ЭПР-сигнала нитрозилгемоглобина при инкубировании крови с Cys-SNO, DEANO и SNAP возросла относительно контроля в большей степени, чем в первой серии и в условиях оксигенации крови. При оксигенации крови со всеми донорами произошло достоверное снижение  $p50$  стандартного. Под действием Cys-SNO оно составило 2,73 мм рт. ст. ( $p<0,05$ ), в присутствии DEANO 3,32 мм рт. ст. ( $p<0,05$ ), а SNAP 2,71 мм рт. ст. ( $p<0,05$ ). Увеличение концентрации метгемоглобина наблюдалось в опыте с Cys-SNO на 278,0% ( $p<0,05$ ), с DEANO на 178,0% ( $p<0,05$ ), а со SNAP 201,0% ( $p<0,05$ ). При взаимодействии доноров оксида азота с оксигенированной кровью существенно снизилось образование нитрозилгемоглобина по сравнению с опытом, где происходила дезоксигенация крови, однако

интенсивность сигнала нитрозилгемоглобина была достоверно большей, чем в контрольном образце.

Взаимодействие гемоглобина с NO сопровождается образованием различных NO-производных гемоглобина. При высоком парциальном давлении кислорода оксигемоглобин под действием NO окисляется в ферри-форму с образованием нитрат-иона. Нитрозилгемоглобин является продуктом, в котором NO взаимодействует с гемическими группами белка [Chan N.L. et al., 2004]. Спектроскопические и кристаллографические исследования  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$  подтверждают разрыв связи  $\text{Fe}^{2+}$ -гема  $\alpha$ -цепи с проксимальным гистидином [Chan N.L. et al., 2004], что облегчает процессы дезоксигенации гемоглобина. Был установлен также еще один сайт связывания NO с гемоглобином – остаток цистеина- $\beta 93$  [Sonveaux P. et al., 2007]. Модифицированный в данном положении гемоглобин известен как S-нитрозогемоглобин. Интерпретация структурных данных S-нитрозогемоглобина показывает, что модификация цистеина- $\beta 93$  оксидом азота в итоге приводит к увеличению SGK [Clementi M.E. et al., 2003]. Инкубирование различных количеств NO или его доноров вызывает сдвиг КДО влево, линейно коррелирующий с уровнем метгемоглобина, что предполагает ведущую роль последнего в модификации кислородсвязывающих свойств гемоглобина [Зинчук В.В., 2006].

Увеличение в нашем эксперименте SGK при инкубировании доноров NO с венозной кровью и в опыте с оксигенацией было обусловлено присутствием достоверно большего количества метгемоглобина. Однако, несмотря на то, что Cys-SNO в опыте с дезоксигенацией крови достоверно повышал содержание окисленного гемоглобина, левостороннего сдвига КДО не наблюдалось. Вероятно, это можно объяснить компенсирующим действием  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ , присутствующим в этом образце. В условиях оксигенации, как и в первой серии эксперимента, также было зафиксировано наличие нитрозилгемоглобина, но интенсивность его сигнала была значительно слабее, что не оказывало решающего значения на положение КДО.

**Полученные результаты** подтверждают способность NO оказывать модулирующее действие на SGK в зависимости от условий оксигенированности крови. Как было показано в нашем исследовании, их влияние реализуется через образование различных NO-производных форм гемоглобина. Образование метгемоглобина вызывает сдвиг КДО влево, в то время как присутствие достаточно большого количества нитрозилгемоглобина в образце оказывает противоположный эффект на ее положение.

*Данная работа выполнена частично благодаря финансовой поддержке Фонда фундаментальных исследований и МЗ РБ.*

**Литература:**

1. Зинчук В.В., Максимович Н.А., Козловский В.И., Балбатун О.А., Пронько Т.П. Дисфункция эндотелия: фундаментальные и клинические аспекты / под ред. Зинчука В.В. - Гродно, 2006. - 183 с.
2. Chan N.L., Kavanaugh JS, Rogers PH, Arnone A. Crystallographic analysis of the interaction of nitric oxide with quaternary-T human hemoglobin // *Biochemistry* – 2004 – Vol. 43 (1) – p. 118-132.
3. Clementi M.E., Orsini F., Schinina M.E., Noia G., Giardina B. Effect of nitric oxide on the transport and release of oxygen in fetal blood // *Biochemical And Biophysical Research Communications* – 2003 – Vol. 302 – p. 515-519.
4. Sonveaux P., Lobysheva I.I., Feron O., McMahon T.J. Transport and peripheral bioactivities of nitrogen oxides carried by red blood cell hemoglobin: role in oxygen delivery // *Physiology*. – 2007. – Vol. 22. – P. 97-112.
5. Stepuro T.L., Zinchuk V.V. Nitric oxide effect on the hemoglobin-oxygen affinity // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2006. - Vol. 57 (1). - P. 29-38.

## **ВЛИЯНИЕ КОЭНЗИМА Q<sub>10</sub> НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ РЕАКТИВНОСТЬ У КРЫС С ХРОНИЧЕСКИМ ДЕФИЦИТОМ НИГРО-СТРИАТНОГО ДОФАМИНА**

**Таланов С.А., Ткаченко М.Н., Присяжная А.Д., Сагач В.Ф.**

*Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины*

Болезнь Паркинсона – экстрапирамидное заболевание, для которого характерна триада симптомов: мышечная ригидность, тремор покоя и олигокинезия. Кроме того, данная патология часто сопровождается вегетативными расстройствами, в том числе сердечно-сосудистыми. Однако, их относят к возрастным изменениям, т.к. паркинсонизм – это болезнь, которой подвержены люди пожилого возраста.

**Цель** данной работы состояла в изучении функционального состояния сердечно-сосудистой системы у крыс с хроническим дефицитом нигро-стриатного дофамина (ДА), лежащего в основе патогенеза БП, и возможности коррекции выявленных нарушений при помощи коэнзима Q<sub>10</sub>.

**Материал и методы.** Эксперименты проводили на изолированных сердцах и грудного отдела аорты 6-месячных крыс линии Вистар-Киото. Было проведено три серии экспериментов: I – интактные животные, II – крысы с хроническим (3 месяца) дефицитом нигро-стриатного ДА, III – животные с хроническим дефицитом ДА, которые в течение 30 дней перед экспериментом получали ежедневно с пищей по 10 мг/кг коэнзима Q<sub>10</sub>.

Систолическое и конечно-диастолическое давление, развиваемое левым желудочком изолированного по Лангендорфу сердца, измеряли при